

Estabelecimento de um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore- (Gesneriaceae)

Lilian Keiko Unemoto, Ricardo Tadeu de Faria*, Beatriz Meneguice e Adriane Marinho de Assis

Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Cx. Postal 6001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. * autor para correspondência. e-mail: faria@uel.br

RESUMO. *Sinningia leucotricha* é uma planta nativa do Paraná, que está sob risco de extinção. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo. Os tratamentos foram: (T1) MS, (T2) MS 50%, (T3) MS 200%, (T4) MS + 1,0 g.L⁻¹ de carvão ativado, (T5) MS 50% + 1,0 g.L⁻¹ de carvão ativado, (T6) MS 200% + 1,0 g.L⁻¹ de carvão ativado. O delineamento foi o inteiramente casualizado com 10 repetições e 5 plantas por repetição. Após 120 dias de semeadura, foram avaliados: altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, massa fresca total e número de brotações. A porcentagem de pegamento foi avaliada 30 dias após o período de aclimatização. O tratamento que proporcionou as maiores médias para todas as características analisadas foi o MS 50% sem adição de carvão ativado (T2). A porcentagem de pegamento foi de 100% em todos os tratamentos.

Palavras-chave: *Sinningia*, preservação, meio de cultura, carvão ativado.

ABSTRACT. Establishment of a protocol for *in vitro* propagation of *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore – Gesneriaceae. *Sinningia leucotricha* is a native plant of Paraná (Brazil), which is considered endangered. The objective of this work was to establish a protocol for *in vitro* propagation of *Sinningia leucotricha*. The treatments were: (T1) MS, (T2) MS 50%, (T3) MS 200%, (T4) MS 100% + 1.0 gL⁻¹ of activated charcoal, (T5) MS 50% + 1.0 gL⁻¹ of activated charcoal and (T6) MS 200% + 1.0 gL⁻¹ of activated charcoal. The experimental design was entirely casualized with 10 replications per treatment, and 5 plants per replication. Plant height, root length, total fresh weight and number of shoots were evaluated 120 days after cultivation. After thirty days of seedling acclimatization, the germination/sticking proportion was evaluated. The higher averages for all analyzed features was the MS 50% without activated charcoal addition (T2), and the germination/ sticking proportion was 100% for all treatments.

Key words: *Sinningia*, preservation, culture medium, activated charcoal.

Introdução

A rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore, pertence à ordem Tubiflorae e família Gesneriaceae. Planta herbácea, nativa do Estado do Paraná, possui folhas totalmente recobertas por densa pilosidade de aspecto lanoso, apresentando coloração prateada e um contraste com flores de coloração avermelhada, atrativo este, de rara beleza (Iuchi e Lopes, 1997).

Essa espécie produz sementes diminutas, ocorrendo predominantemente em afloramentos de rocha (arenitos) em relevo escarpado, e altitudes de aproximadamente 600 a 800 metros, com reduzidas porções de material detrítico, não classificável

especialmente como solo (Embrapa, 1974). Devido às condições da região de origem, verifica-se a necessidade de estudos no fornecimento de nutrientes, bem como a otimização das condições de germinação e propagação, a fim de acelerar o crescimento e tornar o cultivo comercial vantajoso.

Devido à comercialização desregulada, essa espécie, antes encontrada comumente no estado do Paraná, encontra-se atualmente, sob risco de extinção, sendo necessário a adoção de medidas alternativas no intuito de contribuir com a preservação da mesma (Iuchi e Lopes, 1997).

Neste contexto, a propagação *in vitro* pode ser uma importante alternativa, possibilitando a produção de plantas em larga escala, em um período reduzido

de tempo com maior uniformidade e qualidade das mudas em relação aos métodos convencionais. Dessa forma, torna-se possível a produção em massa de mudas para reintrodução e comercialização, coibindo práticas extrativistas (Zorning, 1996). De acordo com Faria *et al.* (2002), o sucesso na tecnologia e aplicação dos métodos de cultura *in vitro* deve-se a uma melhor compreensão dos requerimentos nutricionais das células e tecidos em cultura. A formulação do meio de cultura é essencial para a planta, pois concentra os nutrientes necessários para seu desenvolvimento, podendo ser formulado com diferentes combinações de acordo com os requerimentos de cada espécie.

Muitos autores têm relatado os efeitos benéficos da adição de carvão ativado ao meio de cultura como promotor de crescimento (Shi *et al.*, 2000) e indutor de raízes (George e Ravishankar, 1997). Segundo Tisserat (1982), um dos fatores físicos necessários para o crescimento e desenvolvimento de órgãos vegetativos subterrâneos é a ausência de luz. Dessa forma, o carvão ativado tem sido utilizado em meios de cultura para estimular o enraizamento, devido a sua alta capacidade de excluir a luz do meio e também em diminuir a oxidação das culturas pela presença de fenóis produzidos pelos próprios tecidos.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo, avaliando-se o efeito do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) em diferentes concentrações, bem como a adição de carvão ativado ao meio de cultura.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Departamento de Fitotecnia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Estado do Paraná.

As sementes de rainha-do-abismo, coletadas em casa de vegetação, foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e água deionizada autoclavada, sob agitação por 10 minutos em câmara de fluxo laminar. Após este período, as sementes foram lavadas com água deionizada autoclavada e filtradas utilizando-se filtro de poliéster com 62 fios/cm² previamente autoclavado por 30 minutos em 120°C e 1,5 atm.

As sementes foram cultivadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescido de 1,0 g.L⁻¹ de carvão ativado, 30,0 g.L⁻¹ de sacarose e 7,0 g.L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,2 antes da adição do ágar.

O experimento foi conduzido em sala de crescimento com 2000 lux de luminosidade, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de aproximadamente 25°C ± 0,2°C.

Trinta dias após a semeadura, as plântulas com

aproximadamente 1,5 ± 0,2 cm de altura da parte aérea, foram selecionadas para a realização do experimento, cujos meios de cultura se basearam na mesma formulação utilizada para germinação. Os tratamentos foram os seguintes: (T1) MS 100%, (T2) MS 50% (com a metade da concentração dos sais), (T3) MS 200% (com o dobro da concentração dos sais), (T4) MS 100% + 1,0 g.L⁻¹ de carvão ativado, (T5) MS 50% + 1,0 g.L⁻¹ de carvão ativado, (T6) MS 200% + 1,0 g.L⁻¹ de carvão ativado. A todos esses tratamentos foram adicionados ágar na concentração de 7,0 g.L⁻¹ e 30,0 g.L⁻¹ de sacarose.

Foram vertidos 40 mL de meio de cultura em frascos de vidro com capacidade de 300 mL. Em seguida, as culturas foram transferidas para sala de crescimento sob as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e luminosidade citadas anteriormente.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições contendo 5 plântulas por vidro. Após 120 dias, foram avaliadas as variáveis: altura da parte aérea (da inserção do caule na raiz tuberosa até o ápice), comprimento da maior raiz (da inserção na raiz tuberosa até o maior comprimento atingido pelas raízes na vertical), massa fresca total e número de brotos. Os dados foram submetidos à análise de variância e complementados pelo teste de médias de Tukey com 5% de significância.

As plântulas foram aclimatizadas em bandejas de isopor, contendo fibra de coco como substrato e mantidas em viveiro protegido com tela de polipropileno de coloração preta, cuja retenção do fluxo solar é de 50%. Transcorridos 30 dias após o plantio, foi realizada a avaliação da porcentagem de pegamento das mudas aclimatizadas.

Resultados e discussão

Na Tabela 1, encontram-se os resultados dos diferentes tratamentos no desenvolvimento *in vitro* da rainha-do-abismo.

Foi verificado que nos meios onde ocorreu a adição de carvão ativado (T4, T5 e T6), as plântulas tiveram um desenvolvimento mais lento em relação às plântulas cultivadas em meio sem a adição de carvão ativado. O carvão ativado influenciou negativamente o desenvolvimento da parte aérea e massa fresca total. Tal observação indica que, para esta espécie, ocorreu um melhor desenvolvimento *in vitro* em meios sem a adição de carvão ativado.

Tabela 1. Médias referentes à altura da parte aérea, comprimento de raiz, massa fresca total e número de brotos para os diferentes tratamentos aos 120 dias após o cultivo *in vitro* de rainha-do-abismo.

Tratamentos	Altura da parte aérea	Comprimento de raiz	Massa fresca Total	Número de brotos
-------------	-----------------------	---------------------	--------------------	------------------

	(cm)	(cm)	(g)	
T1	3,36 BC ¹	1,86 A	0,42 B	1,28 AB
T2	4,04 A	1,92 A	0,60 A	1,33 A
T3	3,39 B	1,59 B	0,49 B	1,28 AB
T4	2,89 CD	1,54 B	0,33 C	1,04 C
T5	2,28 D	1,52 B	0,29 C	1,08 C
T6	2,04 E	0,98 C	0,29 C	1,15 BC
CV %	23,31	22,42	26,35	21,67

(T1) MS 100%, (T2) MS 50%, (T3) MS 200%, (T4) MS 100% + 1 g.L⁻¹ de carvão ativado, (T5) MS 50% + 1 g.L⁻¹ de carvão ativado, (T6) MS 200% + 1 g.L⁻¹ de carvão ativado. ¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Corrêa *et al.* (2003), testando o efeito da adição de carvão ativado na formação de estruturas semelhantes a raízes tuberosas em batata-doce (*Ipomoea batatas* L. Lam), verificou que a presença de carvão ativado afetou negativamente a produção de estruturas semelhantes a raízes tuberosas, mesmo na presença de reguladores de crescimento. Porém, na propagação *in vitro* de orquídeas, a adição de carvão ativado ao meio MS é utilizada com sucesso para inúmeras espécies (Collins e Dixon, 1992; Faria *et al.*, 2002).

Os dados relativos à altura da parte aérea indicaram que houve um melhor desenvolvimento em meio Murashige e Skoog (MS) reduzido a 50%, sem a adição de carvão ativado (T2). Paiva *et al.* (1997), estudando a propagação *in vitro* de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.), planta que também pertence à família Gesneriaceae, observou que a redução na concentração do meio MS para 50%, sem a adição de carvão ativado foi favorável tanto para a obtenção de um maior número de brotos quanto para a maior média em altura.

Considerando a variável comprimento de raiz, não houve diferença significativa entre MS reduzido a 50% (T2) e MS 100% (T1), ambos sem a adição de carvão ativado em sua composição. Porém, no T3, MS 200%, a média do comprimento das raízes foi significativamente menor, indicando que tal concentração foi prejudicial ao desenvolvimento destas.

Os maiores valores para a variável massa fresca total foram verificados em meio MS 50%, sem adição de carvão ativado (T2), sendo que as concentrações maiores não favoreceram o desenvolvimento *in vitro* desta planta. Trabalhos com a violeta-africana (*Saintpaulia ionantha* - Gesneriaceae) têm indicado a sensibilidade destas plantas a altos níveis de sais solúveis (Shanks, 1960; Scharpf e Grantzau, 1985).

Gomes e Shepherd (2000), estudando a propagação *in vitro* de *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae), observaram que esta espécie teve seu crescimento favorecido em meios de cultura ácidos e com baixa concentração de nutrientes. Iuchi e Lopes (1997), estudando a nutrição de plantas de rainha-do-abismo germinadas e cultivadas em areia, obtiveram as maiores médias no desenvolvimento de parte aérea, raízes, e número de hastes, na menor concentração de adubo testada (25 mL.L⁻¹).

Não foi possível verificar diferenças significativas no número de brotos formados entre MS 100% (T1), MS 50% (T2) e MS 200% (T3), porém, as menores médias foram verificadas nos tratamentos com adição de carvão ativado (Figura 1). Esta variável é de suma importância na comercialização das plantas, visto que, quanto maior o número de brotos, maior a probabilidade na obtenção de flores.

A possibilidade da redução dos sais do meio MS, para a propagação de diferentes espécies também tem sido sugerida por outros autores como Oliveira (1994), Pasqual *et al.* (1998) e Araújo *et al.* (2004), buscando um melhor desenvolvimento das plantas e a redução de custos.

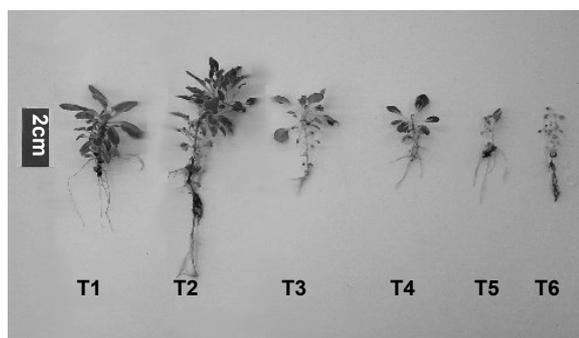


Figura 1. Plantas de rainha-do-abismo (*Sinningia leucotricha*), nos tratamentos T1 (MS), T2 (MS 50%), T3 (MS 200%), T4 (MS + 1g.L⁻¹ de carvão ativado), T5 (MS 50% + 1g.L⁻¹ de carvão ativado), T6 (MS 200% + 1g.L⁻¹ de carvão ativado).

Um outro fator importante a ser verificado no presente estudo é a alta proporção de pegamento *ex vitro* das plântulas na fase de aclimatização. A aclimatização é a fase da micropropagação em que ocorre a transferência das mudas produzidas *in vitro* para o ambiente externo, a casa-de-vegetação (Deberg e Maene, 1981). De acordo com Costa (1998), a fase de aclimatização é muito delicada porque além de representar um estresse para a plântula, existe o risco de infecções por fungos e bactérias. Um grande número de plantas micropropagadas não sobrevive quando transferidas das condições *in vitro* para o ambiente externo. Um fator importante para amenizar esse problema é a obtenção de plântulas saudáveis com sistema radicular e parte aérea proporcionais, a fim de atingir maior frequência de pegamento.

A proporção de pegamento das plantas aclimatizadas de rainha-do-abismo em todos os tratamentos foi de 100%, demonstrando assim, a possibilidade de uma rápida e eficaz obtenção de mudas saudáveis desta espécie.

Conclusão

A redução à metade da concentração dos sais do meio MS, sem a adição do carvão (T2), pode ser considerada adequada para promover maior

crescimento da parte aérea, maior comprimento de raízes e maior massa fresca das plântulas, sendo, portanto, um protocolo recomendado para o cultivo *in vitro* de rainha-do-abismo.

Referências

- ARAÚJO, A.G. *et al.* Multiplicação *In vitro* de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.). *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 51, n. 293, p. 117-127, 2004.
- COLLINS, M.T.; DIXON, K.W. Micropropagation of an australian terrestrial orchid *Diuris longifolia* R. Br. *Austr. J. Exp. Agric.*, v. 32, p. 131-135, 1992.
- CORRÊA, R.M. *et al.* Potencial do carvão ativado, filtro amarelo e interação fotoperíodo/ temperatura na formação de raízes tuberosas de batata-doce *in vitro*. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 423-430, 2003.
- COSTA, A.M.M. Fisiologia da aclimatização. In: TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. (Ed.). *Micropropagação de plantas ornamentais*. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998. p. 63- 67.
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.V. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hortic.*, Amsterdam, v. 14, p. 335-345, 1981.
- EMBRAPA-EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. *Levantamento de reconhecimento de solos do estado do Paraná*. Curitiba: Embrapa- SNLCS/ Suudesul/ Iapar, 1974. 21p. (Boletim Técnico).
- FARIA, R.T. *et al.* Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.*, Viçosa, v. 2, n. 3, p. 489-492, 2002.
- GEORGE, P.S.; RAVISHANKAR, G.A. *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. *Plant Cell Rep.*, Berlin, v. 16, n. 6, p. 490-494. 1997.
- GOMES, M.A.N.; SHEPHERD, S.L.K. Estudo de nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de cerrado. *Rev. Bras. Bot.*, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 153-159. 2000.
- IUCHI, V.L.; LOPES, L.C. Crescimento de Rainha-do-abismo (*Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore – Gesneriaceae em resposta à nutrição. *Rev. Bras. Hortic. Ornam.*, Campinas, v. 3, n. 1, p. 53-57, 1997.
- MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, Copenhagen, v. 15, p. 473-479, 1962.
- OLIVEIRA, P.D. *Propagação in vitro de crisântemo (DendratHEMA grandiflora Tzelev.) cv. Orange Reagen*. 1994. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Lavras, 1994.
- PAIVA, P.D.O. *et al.* Propagação *in vitro* de Gloxínia. *Rev. Bras. Hortic. Ornam.*, Campinas, v. 3, n. 2, p. 29-41, 1997.
- PASQUAL, M. *et al.* *Cultura de tecido s-* Introdução: Fundamentos básicos. Lavras: Ufla/Faepe, 1998.
- SCHARPF, H.C.; GRANTZAU, E. Correct N:K rations guarantee successful culture and plant tolerance should not lead to a salt enrichment in the substrate. *Gb + Gw*, v. 85, n. 10, p. 403-405, 1985 apud *Hortic. Abstr.*, v. 55, n. 8, p. 633, 1985.
- SHANKS, J.B. Some suggestions for planning a fertilizer program. *Maryland Flour*, Timonium, v. 68, p. 4-8, 1960.
- SHI, Y. Z. *et al.* *In vitro* conservation of *Dendrobium officinale* at low temperature. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, [sl] v. 6, p. 326-330. 2000.
- TISSERAT, B. Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures. *Euphytica*, Wageningen, v. 31, n. 1, p. 201-214, 1982.
- ZORNING, R.K. Micropropagação de bromélias. *Bromélia*, Rio de Janeiro, v. 3, n. 3, p. 3-8, 1996.

Received on July 05, 2005.

Accepted on July 24, 2006.